doi:10.11659/jjssx.04E019056

·基础研究·

# 巴戟天水提取物对大鼠精索静脉曲张所致睾丸组织细胞凋亡的抑制作用

林文东[1],丁小明[2],李德水[2] (1.泉州医学高等专科学校动物实验室,福建 泉州 362011;2.泉州医学高等专科学校基础医学部解剖教研室,福建 泉州 362011)

[摘 要] **目的** 分析巴戟天水提取物对精索静脉曲张(VC)大鼠睾丸组织 Livin 和 Smac 的表达及意义。**方法** 选取 30 只雄性 SD 大鼠分为假手术组、模型组和观察组,每组 10 只。模型组及观察组构建精索静脉曲张(VC)模型,假手术组不做结扎;假手术组采用生理盐水干预,模型组造模后生理盐水灌胃,观察组造模后巴戟天水提取物灌胃;术前及术后称重,术后检测大鼠睾丸及附睾指数;取出左侧睾丸检测切片中 Livin、Smac 表达情况及细胞凋亡情况。**结果** 造模前及造模后 3 组大鼠体质量检测结果差异无统计学意义($P>0.05$);大鼠睾丸指数及附睾指数,观察组均显著高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),但观察组与假手术组差异无统计学意义($P>0.05$);大鼠睾丸组织凋亡指数,观察组显著低于模型组,且模型组显著高于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$);大鼠睾丸组织 Livin 阳性细胞率及平均光密度,观察组均显著高于模型组,且显著低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$);大鼠睾丸组织 Smac 阳性细胞率及平均光密度,观察组均显著低于模型组,且显著低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 采用巴戟天水提取物对 VC SD 大鼠干预后,可有效改善大鼠睾丸组织 Livin 和 Smac 表达。

[关键词] 巴戟天;精索静脉曲张;睾丸组织;Livin;Smac;细胞凋亡

[中图分类号] R691.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-04-11

## Inhibitory effect of Morinda officinalis water extract on testicular cell apoptosis induced by varicocele in SD rats

LIN Wen-dong[1], DING Xiao-ming[2], LI De-shui[2] (1. Animal Laboratory, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362011, China; 2. Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362011, China)

**Abstract: Objective** To analyze the expression and significance of Morinda officinalis water extract on Livin and Smac in testicular tissue of varicocele (VC) rats. **Methods** Selected 30 male SD rats and divided them into the sham operation group, the model group, and the observation group, with 10 rats in each group. VC model was constructed in the model group and the observation group, and no ligation was performed in the sham operation group. Normal saline was used in the sham operation group, normal saline was given to the model group after modeling, and the observation group was given the Morinda officinalis water extract after modeling. The indexes of testicles and epididymis were measured after operation. Extracted the left testicle to detect the expression of Livin and Smac, and to detect the cell apoptosis. **Results** There was no significant difference in body weigh among the three groups before and after modeling ($P>0.05$). The testicular index and epididymal index in the observation group were significantly higher than those in the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); but there was no statistically significant difference between the observation group and the sham operation group ($P>0.05$). The apoptosis index of testicular tissue in the observation group was significantly lower than that of the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); the model group was significantly higher than that of the sham operation group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive cells rate and average optical density of Livin in testicular tissue in the observation group were significantly higher than those in the model group, and they were significantly lower than those in the sham operation group, with statistically significant differences ($P<0.05$). The rate of positive cells and average optical density of Smac in testicular tissue in the observation group were significantly lower than those in the model group, and they were significantly lower than those in the sham operation group, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** The Livin and Smac expressions in testicular tissue of varicocele SD rats could be effectively improved after the intervention of the Morinda officinalis water extract.

**Keywords:** Morinda officinalis; varicocele; testicular tissue; Livin; Smac; apoptosis

精索静脉曲张(varicocele,VC)是临床中较为常见的导致男性不育的疾病,且多发生在左侧。青春期是静脉曲张好发时期,对男性生殖功能影响较大[1]。VC 是多由静脉瓣功能受损及静脉血液回流受阻导致的蔓状静脉丛扩张及迂曲现象[2]。临床主要通过手术治疗,可显著改善精液质量及精子活力,但其疗效常无法令人满意[3]。在采用保守治疗时发现,中成药可有效促进精子活力,提高精子质量,具有明显优势[4]。

[基金项目] 泉州市科技计划项目(2016Z059)

[通信作者] 丁小明,E-mail:179533609@qq.com

中药巴戟天属茜草科植物干燥根,其味甘辛、性微温、经肝经,具有抗抑郁、抗炎、增强免疫、抗衰老等功能[5]。传统中医理论认为,肾气旺盛、肾精充足,生殖功能维持正常,而肾气亏虚、肾精不足,其生殖功能常呈现明显异常,因而中医学认为人体生殖功能,取决于肾气及肾精盛衰。Livin 和 Smac 是细胞内重要的凋亡调节因子,是对细胞凋亡研究较为常见的指标。目前巴戟天水提取物对 VC 的治疗作用机制鲜有报道,因而本研究采用 VC 大鼠作为研究对象,分析巴戟天水提取物对 VC 大鼠睾丸组织 Livin 和 Smac 的表达及意义,为该药的进一步开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取 30 只 6 ~ 8 周 SPF 级雄性 SD 大鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司),体质量 180 ~ 300 g。大鼠均采用普通饲料喂养,自由摄食及饮水,饲养环境温度 20 ~ 22 ℃。所用抗体均购自 CST,所用试剂盒购自南京福麦斯生物科技有限公司。

### 1.2 实验分组

将所有大鼠依照体质量编号,并采用随机信封法将其分为假手术组、模型组和观察组,每组 10 只。假手术组大鼠不行左侧肾静脉结扎,仅分离精索静脉后关闭腹腔;模型组大鼠行左侧静脉部分结扎,术后 4 周每天固定时间点用 1 mL 生理盐水灌胃,不给药,常规饲养持续 4 周;观察组大鼠造模 4 周后每天固定时间点用 300 mg/kg 巴戟天水提取物灌胃,常规饲养 4 周。

### 1.3 给药剂量及模型制备

采用经典公式计算给药剂量,成人巴戟天用药量为 250 mg/kg,水提取物占比 20%,依照等效剂量的 6.25 倍计算,SD 大鼠给药用量为 6.25 × 250 × 20% = 300 mg/kg。

所有 SD 大鼠均采用 5% 水合氯醛腹腔麻醉,构建 VC 模型,于精索内静脉汇入肾静脉近侧平行放置头皮针(0.7 mm),使用 4 号丝线将头皮针与肾静脉结扎,后小心取出头皮针,造成肾静脉局部狭窄;假手术组仅游离左肾静脉但不行结扎术。以双侧肾体积相似但左侧精索静脉明显曲张以上则记为建模成功。

### 1.4 标本采集及检测

在手术前及结束后称重,手术给药结束后过量麻醉处死大鼠,取睾丸及附睾组织称重,检测大鼠睾丸及附睾指数,取出大鼠左侧睾丸,生理盐水冲洗,使用甲醛固定,并制备石蜡切片。采用免疫组化法检测切片中 Livin、Smac、Caspase-3 及 Caspase-9 表达情况,所有操作均严格遵照 SP 试剂盒说明书进行,在检测时若细胞呈棕黄色则判定为阳性,计算蛋白表达平均光密度值及阳性细胞百分率[6]。采用原位脱氧核苷酸转移酶介导缺口末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡情况[6]。严格遵照试剂盒说明书进行操作,光镜下检测时若细胞核呈现黄色则记为凋亡阳性细胞,颗粒固缩,凝集于细胞核膜下,核膜呈圆形、月牙形斑块状、椭圆形,10 倍视野下检查每张切片,最高倍视野凋亡细胞数计数,并计算凋亡指数。

### 1.5 统计学方法

使用 SPSS 20.0 行统计学分析,计量资料以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,后行 $t$ 检验分析两组间数据差异,采用方差检验分析多组间数据资料差异,$P < 0.05$为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠体质量比较

造模前及造模后 3 组大鼠体质量检测结果差异无统计学意义($F = 1.893, P > 0.05$;$F = 2.012, P > 0.05$),见表 1。

**表 1 3 组大鼠体质量检测比较($n = 10$,g)**

| 组别 | 造模前 | 造模后 |
|---|---|---|
| 假手术组 | 228.47 ± 19.38 | 402.38 ± 18.39 |
| 模型组 | 231.83 ± 20.91 | 403.91 ± 20.74 |
| 观察组 | 230.83 ± 18.83 | 402.42 ± 20.51 |

### 2.2 各组大鼠睾丸及附睾指数比较

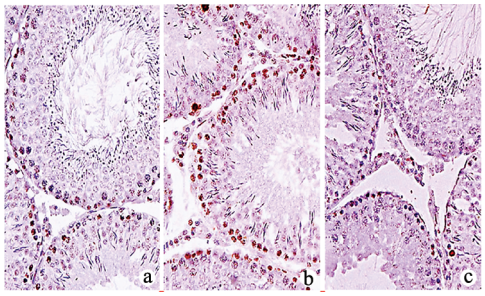
经检测各组大鼠睾丸及附睾指数发现,观察组大鼠睾丸指数及附睾指数均显著高于模型组,差异有统计学意义($F = 5.382, P < 0.05$;$F = 4.394, P < 0.05$),但观察组及假手术组大鼠比较差异无统计学意义($t = 0.843, P > 0.05$;$t = 0.673, P > 0.05$),见表 2。

**表 2 3 组大鼠睾丸及附睾指数检测比较($n = 10$, $\times 10^{-3}$)**

| 组别 | 附睾指数 | 睾丸指数 |
|---|---|---|
| 假手术组 | 3.53 ± 0.31 | 8.73 ± 0.52 |
| 模型组 | 2.63 ± 0.29 | 7.43 ± 0.43 |
| 观察组 | 3.67 ± 0.32 | 8.81 ± 0.53 |

### 2.3 各组大鼠睾丸组织凋亡指数比较

采用 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况,结果显示,观察组大鼠睾丸组织生精细胞凋亡指数为(3.01 ± 0.62)%,低于模型组(19.37 ± 1.29)%,差异有统计学意义($t = 27.482, P < 0.05$);且模型组高于假手术组(1.83 ± 0.54)%,差异有统计学意义($t = 32.198, P < 0.05$),见图 1。




a:假手术组;b:模型组;c:观察组

**图1 Tunel 染色结果(×40)**

### 2.4 各组大鼠睾丸组织 Livin 及 Smac 蛋白表达检测结果

3 组大鼠睾丸组织中 Livin 及 Smac 蛋白表达检测结果显示,观察组大鼠睾丸组织 Livin 阳性细胞率及平均光密度均显著高于模型组、低于假手术组;观察组大鼠睾丸组织 Smac、Caspase-3、Caspase-9 阳性细胞率及平均光密度均低于模型组、高于假手术组,以上差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表3。

**表3 3 组大鼠睾丸组织 Livin 及 Smac 蛋白表达检测结果($\bar{x}\pm s$,$n=10$)**

| 组别 | 阳性细胞率(%) | | | | 平均光密度(D) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Livin | Smac | Caspase-3 | Caspase-9 | Livin | Smac | Caspase-3 | Caspase-9 |
| 假手术组 | 60.83±4.92 | 22.63±3.37 | 13.28±2.19 | 21.03±4.82 | 165.38±8.29 | 127.37±4.92 | 102.87±10.93 | 110.83±9.84 |
| 模型组 | 19.38±2.47 | 52.31±4.01 | 49.58±3.28 | 67.43±9.34 | 134.28±6.93 | 154.93±8.23 | 161.23±12.84 | 169.27±10.39 |
| 观察组 | 50.12±3.92 | 27.91±3.19 | 20.39±4.12 | 30.92±6.43 | 156.94±7.91 | 132.93±4.62 | 121.82±11.29 | 128.46±11.74 |
| $F$ | 10.382 | 31.289 | 29.381 | 31.282 | 8.952 | 12.381 | 18.293 | 21.283 |
| $P$ | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

## 3 讨论

VC 是较为常见的泌尿系统疾病,也是导致青壮年男性不育的主要疾病之一[7]。VC 常引起睾丸组织微动脉异常。有研究发现,VC 使精索静脉血液返流,导致睾丸组织中 5-HT 异常聚集,引发睾丸内微动脉剧烈收缩,引起空泡样变性及间质细胞水肿,且纤维组织逐渐取代间质细胞,从而出现间质纤维化,抑制雄激素合成,影响患者生精功能 ,因而 VC 可能损伤青春期男性生精功能,使精子畸变,并损伤其生殖系统[8]。有学者采用结扎左肾静脉建立实验性 VC 大鼠模型,使该模型大鼠睾丸组织病理损伤以阻滞精子发生、生精上皮退化、精曲小管萎缩及生精细胞脱落[9]。本研究即采用该方法成功构建 VC 动物模型。

一般情况下,器官指数指动物器官重量与体重比值。生理条件下,动物各个器官指数相对恒定,波动范围很小[10]。而在病理条件下,常会引起器官重量变化进而导致器官指数出现大范围波动,若水肿、充血及肥大增生多表现为器官指数增大;而当器官出现退行性改变甚至萎缩时则器官指数减小[11]。因此某种程度上可选择器官指数作为评估器官损伤的指标之一。本研究显示,采用巴戟天水提取物灌胃后可有效改善 VC 模型大鼠的附睾指数及睾丸指数,提示巴戟天水提物可有效改善 VC 大鼠睾丸及附睾组织功能,避免其出现退行性改变或萎缩。巴戟天水提物具有良好的温肾阳的作用,且可有效地强筋健骨、去湿驱寒。VC 属于血管病变,其主要表现为精索内蔓状静脉丛异常伸长、扩张、迂曲,治疗无效则可能导致睾丸功能减退,而采用巴戟天水提物对 VC 动物模型干预后显著改善了 VC 大鼠睾丸功能,可能是通过改善血液流动情况,增强精索静脉管壁及周围组织的厚度,改善精索静脉回流,进而提高疗效。

多项临床研究证实,Livin 是机体内重要的细胞凋亡抑制因子,含有一个 RING 结构和 BIR 结构[12]。主要通过其 BIR 区与 Caspase 结合,抑制 Caspase 酶的活性,导致 Caspases 蛋白的失活和降解,尤其是抑制 Caspase-3、Caspase-9 的活性,从而起到抑制细胞凋亡的作用。RING 结构具有与 E3 泛素连接酶相同的活性,BIR 结构可与线粒体源性激活半胱天冬酶集合关键部位,也是与抑制凋亡蛋白酶 Caspase 的关键位点[13]。有研究显示,Livin 在人正常组织中的表达分布及亚细胞分布的研究结果差异较大。Livin 基因在妊娠晚期胎盘中 Livin 蛋白量高表达显著增高,表达较高的组织有心、肺、卵巢等,在健康成人的大多数终末分化组织中低表达或不表达[14]。另有研究指出,在人睾丸组织中 Livin 有一定程度表达,但在睾丸性不育症患者生精细胞中表达显著降低;Livin 在浅表性膀胱癌、胃肠道肿瘤等多种恶性肿瘤组织中呈高表达,这与其抑制肿瘤细胞的凋亡有着密切关系,说明在不同的疾病中 Livin 的作用存在差异[15-16]。Smac 是人体内重要的内源性线粒体蛋白,其并不会诱导正常细胞凋亡,受到刺激后释放到细胞质中,主要通过与 IAPs 特异性结合提高 Caspase 活性,促进细胞凋亡[17]。Caspase 家族是执行细胞凋亡的蛋白酶家族,是细胞在各种死亡信号刺激后发生的一系列级联激活效应,其中 Caspase-3 是凋亡的关键蛋白酶,活化后通过酶灭活凋

亡抑制物、酶解细胞外基质、裂解 DNA 修复相关因子 3 种机制使细胞裂解;Caspase-9 是 Caspase 家族中的促凋亡因子之一,主要参与细胞凋亡的线粒体途径,能激活下游的 Caspase 酶原引起级联反应,增强了酶原的自活化和 Caspase-3 诱导的细胞凋亡过程。本研究结果显示,观察组大鼠睾丸组织 Livin 水平显著高于模型组,Smac、Caspase-3 及 Caspase-9 水平显著低于模型组,与上述研究结果基本一致[14-17]。

巴戟天是应用较广的传统壮阳补肾类药物,其主要化学成分是蒽醌类、糖类、脂类、甾体化合物、环烯醚萜苷类及微量元素,可有效促进雄性生殖功能,增加垂体及大鼠睾丸重量,促进垂体分泌,增加精子活力及数量,降低精子畸形率[18-21]。本研究结果表明,采用巴戟天水提取物对 VC 模型组大鼠干预后,可有效调剂睾丸组织 Livin 水平与 Smac 水平,纠正睾丸正常组织过度凋亡,提高活性,提示巴戟天水提取物可有效改善精索静脉曲张睾丸组织中细胞凋亡及增殖活性,进而起到治疗效果,具有一定的应用潜力。进一步分析发现,巴戟天水提取物内含有的七叶皂苷、黄酮类药物与该作用密切相关。巴戟天中的七叶皂苷类成分可有效起到保护静脉壁胶原纤维和抗渗出、抗炎作用,并可实现逐步改善甚至恢复静脉血管管壁的收缩功能及弹性功能,有效降低静脉压的同时能显著提高静脉血液回流速度。而巴戟天中的黄酮类成分可有效起到抗氧化及抗炎作用,显著提高静脉张力,提高淋巴回流速度的同时降低血管通透性,减轻 VC 大鼠的水肿状态,进而改善体内细胞凋亡。

综上所述,采用巴戟天水提取物对 VC 大鼠干预后,可有效改善大鼠睾丸组织 Livin 和 Smac 表达。但本次研究并未对巴戟天水提取物的具体作用机制进行分析,有待后续深入研究。

## [参考文献]


[1] Ylldlrlm IO, Sagllk S, Çelik H. Conventional and ZOOMit DWI for evaluation of testis in patients with ipsilateral varicocele[J]. AJR Am J Roentgenol, 2017, 208(5): 1045 - 1061. doi: 10.2214/AJR.16.17292.

[2] 于喜才,薛建国. 从"瘀热"论治精索静脉曲张致不育的经验[J]. 国际中医中药杂志, 2016, 38(11): 1035 - 1036. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673 - 4246.2016.11.022.

[3] Dede O, Teke M, Daggulli M, et al. Elastography to assess the effect of varicoceles on testes: a prospective controlled study[J]. Andrologia, 2016, 48(3): 257 - 261. doi: 10.1111/and.12440.

[4] Tsili AC, Xiropotamou ON, Sylakos A, et al. Potential role of imaging in assessing harmful effects on spermatogenesis in adult testes with varicocele[J]. World J Radiol, 2017, 9(2): 34 - 45. doi: 10.4329/wjr.v9.i2.34.

[5] Asghari A, Akbari G, Galustanian G. Magnesium sulfate protects testis against unilateral varicocele in rat[J]. Anim Reprod, 2017, 14(142): 442 - 451. doi: 10.21451/1984 - 3143 - AR803.

[6] 舒明明. 复发性流产绒毛组织中细胞凋亡信号通路的研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.

[7] Hassanpour H, Bigham SA, Karimi I, et al. Comparative expression analysis of HSP70, HSP90, IL-4, TNF, KITLG and KIT-receptor gene between varicocele-induced and non-varicocele testes of dog[J]. Int J Fertil Menopausal Stud, 2017, 11(3): 148 - 155. doi: 10.22074/ijfs.2017.5020.

[8] 柳良仁,杨 博,任尚青,等. 精索静脉曲张外科治疗进展[J]. 西部医学, 2016, 28(2): 285 - 287. doi: 10.3969/j.issn.1672 - 3511.2016.02.042.

[9] Halpern J, Mittal S, Pereira K, et al. Percutaneous embolization of varicocele: technique, indications, relative contraindications, and complications[J]. Asian J Androl, 2016, 18(2): 234 - 238. doi: 10.4103/1008 - 682X.169985.

[10] García FR, Baleato GS, Padhani AR, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: the fingerprints of cancer?[J]. Diagn Interv Radiol, 2016, 22(1): 75. doi: 10.5152/dir.2015.15009.

[11] 宋景艳,孙振高. 精索静脉曲张致睾丸生精功能障碍的机制研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2016, 25(2): 186 - 189. doi: 10.3969/j.issn.1004 - 3845.2016.2.017.

[12] Belay RE, Huang GO, Shen KC, et al. Diagnosis of clinical and subclinical varicocele: how has it evolved?[J]. Asian J Androl, 2016, 18(2): 182 - 185. doi: 10.4103/1008 - 682X.169991.

[13] Friedman AA, Palmer LS, Maizels M, et al. Pediatric acute scrotal pain: a guide to patient assessment and triage[J]. J Pediatr Urol, 2016, 12(2): 72 - 75. doi: 10.1016/j.jpurol.2016.03.003.

[14] 成克伦,钟丽萍,程晓苗,等. Livin 在睾丸性不育症生精细胞中的表达及意义[J]. 实用医技杂志, 2011, 18(9): 911 - 912. doi: 10.3969/j.issn.1671 - 5098.2011.09.008.

[15] 黄敏玉,黄 群,吴 军,等. 磷酸甘油酸变位酶-1 在不同分型前列腺炎患者睾丸组织中的表达及临床意义[J]. 河北医学, 2017, 23(5): 719 - 723. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 6233.2017.05.005.

[16] 杨险峰,付 聪,刘杨青,等. 紧密连接蛋白 11 在非梗阻性无精子症患者睾丸组织中的表达[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(3): 221 - 225. doi: 10.13263/j.cnki.nja.2018.03.006.

[17] Verim S, Uguz S, Celikkanat S, et al. Prognostic predictors of fertility in young adult patients with varicocele[J]. J Ultrasound Med, 2016, 35(6): 1241 - 1250. doi: 10.7863/ultra.15.07072.

[18] 娄勇军,王 佳,黄玉秋,等. 巴戟天及其炮制品对肾阳虚大鼠 HPA 轴功能的改善作用[J]. 中成药, 2018, 40(11): 181 - 185. doi: 10.3969/j.issn.1001 - 1528.2018.11.033.

[19] 王 佳,史 辑,魏晓峰,等. 巴戟天不同炮制品对肾阳虚不育大鼠改善作用研究[J]. 中药材, 2017, 40(8): 1826 - 1832. doi: 10.13863/j.issn1001 - 4454.2017.08.017.

[20] 赵祥升,杨美华,吴海峰,等. 巴戟天中环烯醚萜苷和蒽醌在电喷雾离子源负离子模式下的质谱裂解行为[J]. 质谱学报, 2018, 39(3): 342 - 350. doi: 10.7538/zpxb.2017.0100.

[21] 华海应,高华强,朱文艳,等. 补肾健脾化瘀中药对难治/复发再生障碍性贫血患者骨髓单个核细胞集落形成的影响[J]. 山东医药, 2018, 58(38): 90 - 92. doi: 10.3969/j.issn.1002 - 266X.2018.38.026.


(编辑:陈庆利)